

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

B.S.K.B.
Kijiro WATANABE et al
4-29-99
20-4559
2 of 4
JCS25U
09/30/99
04/29/99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 1998年 4月30日

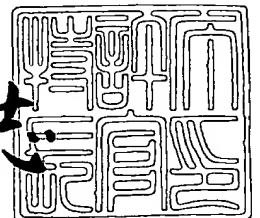
出 願 番 号
Application Number: 平成10年特許願第120550号

出 願 人
Applicant (s): 住友化学工業株式会社

1999年 3月19日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

伴佐山 建志



出証番号 出証特平11-3015377

【書類名】 特許願

【整理番号】 P149179

【提出日】 平成10年 4月30日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/52

【発明の名称】 ラフィノース合成酵素遺伝子

【請求項の数】 12

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社
社内

【氏名】 渡辺 英二郎

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住友化学工業株式会社
社内

【氏名】 大江田 憲治

【特許出願人】

【識別番号】 000002093

【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社

【代表者】 香西 昭夫

【代理人】

【識別番号】 100093285

【弁理士】

【氏名又は名称】 久保山 隆

【電話番号】 06-220-3404

【選任した代理人】

【識別番号】 100094477

【弁理士】

【氏名又は名称】 神野 直美

【電話番号】 06-220-3404

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010238

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9701007

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ラフィノース合成酵素遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子。

【請求項 2】

配列番号2で示される塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 記載のラフィノース合成酵素遺伝子の部分塩基配列を有する DNA 断片。

【請求項 4】

ハイブリダイゼーション法によりラフィノース合成酵素遺伝子を含む DNA 断片を検出する方法において、請求項 3 記載の DNA 断片をプローブに用いるラフィノース合成酵素遺伝子を含む DNA 断片の検出方法。

【請求項 5】

PCR(Polymerase Chain Reaction)法によりラフィノース合成酵素遺伝子を含む DNA 断片を増幅する方法において、請求項 1 または 2 記載のラフィノース合成酵素遺伝子の部分塩基配列を有するプライマーを用いるラフィノース合成酵素遺伝子を含む DNA 断片の増幅方法。

【請求項 6】

請求項 4 記載の検出方法によりラフィノース合成酵素遺伝子を含む DNA 断片を検出し該 DNA 断片を単離する工程を含むラフィノース合成酵素遺伝子の取得方法。

【請求項 7】

請求項 5 記載の増幅方法によりラフィノース合成酵素遺伝子を含む DNA 断片を増幅し該 DNA 断片を単離する工程を含むラフィノース合成酵素遺伝子の取得方法。

【請求項 8】

請求項1または2記載のラフィノース合成酵素遺伝子がプロモーターと連結されてなるDNA断片。

【請求項9】

請求項1もしくは2記載のラフィノース合成酵素遺伝子または請求項3もしくは8記載のDNA断片を含有するベクター。

【請求項10】

請求項8記載のDNA断片または請求項9記載のベクターが宿主の細胞に導入されてなる形質転換体。

【請求項11】

宿主が微生物である請求項10記載の形質転換体。

【請求項12】

宿主が植物である請求項10記載の形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ラフィノース合成酵素遺伝子に関する。

【0002】

【従来の技術】

ラフィノース類オリゴ糖は、一般式として α -D-ガラクトピラノシル-(1 \rightarrow 6) n - α -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 2)- β -D-フルクトフラノシドで示されるショ糖の誘導体であり、 $n=1$ の場合にはラフィノース、 $n=2$ の場合にはスタキオース、 $n=3$ の場合にはベルバスコース、 $n=4$ の場合にはアジュコースと呼ばれる。

ラフィノース類オリゴ糖は、ショ糖を除けば、植物で最も含量の多いオリゴ糖であり、例えば、トウヒ等のマツ科の裸子植物、および、ダイズ、インゲンマメ等のマメ科、ナタネ等のアブラナ科、甜菜等のアカザ科、ワタ等のアオイ科、ポプラ等のヤナギ科等の被子植物などの高等植物のみならず、クロレラにも含まれる。該オリゴ糖は、多くの植物において、貯蔵器官や種子における貯蔵糖としての役割を果たし、また、ある種の植物においては、組織間を糖が移動する現象における転流糖としての役割を果たしている。

このようなラフィノース類オリゴ糖は、食品中に適量存在すると腸内細菌フローラの状態を健全にする効果を示すことが知られている。このため、ラフィノース類オリゴ糖は機能性食品素材として一部の食品に添加され、特定保健用食品分野において利用され始めている。

一方、ラフィノース類オリゴ糖の分解には α ガラクトシダーゼが必要であるが、ヒトなどの動物はこの酵素を持たず、ラフィノース類オリゴ糖を腸内細菌の働きによってのみ分解するため、ラフィノース類オリゴ糖等の α ガラクトシドを過度に摂取すると鼓腸を起こす。そこで、マメ科植物、とりわけダイズにおいては、種子中に多く存在するラフィノース類オリゴ糖の低減が求められている。

かかるラフィノース類オリゴ糖は、多くの植物においてショ糖を初発とするラフィノース類オリゴ糖生合成系により生成される。この生合成系は、通常、ショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基に、ガラクトチノール由来のガラクトシル基が α (1 \rightarrow 6)結合によって順次付加される反応により構成されている。該生合成系の最初の段階において、ショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基に、ガラクトチノール由来のD-ガラクトシル基を α (1 \rightarrow 6)結合させることによりラフィノースを生成させる反応に関与する酵素がラフィノース合成酵素である。該酵素は前記生合成系における律速段階となっていることが示唆されており、該酵素がラフィノース類オリゴ糖の生合成の制御に重要である。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

そこで、植物のラフィノース類オリゴ糖の含量を制御するために上記のようなラフィノース合成酵素の植物における発現量や活性を変化させる技術に利用可能なラフィノース合成酵素遺伝子が切望されている。

【0004】

【課題を解決するための手段】

このような状況下、本発明者らは鋭意検討した結果、ダイズ由来の新たなラフィノース合成酵素遺伝子を見出し、本発明に至った。

すなわち、本発明は、配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列

を有するラフィノース合成酵素遺伝子（以下、本発明遺伝子と記す。）、配列番号2で示される塩基配列またはその一部を有するDNA断片、該DNA断片を利用するラフィノース合成酵素遺伝子の検出方法、本発明遺伝子の部分塩基配列を利用するラフィノース合成酵素遺伝子の増幅方法、該検出方法または該増幅方法を利用するラフィノース合成酵素遺伝子の取得方法、本発明遺伝子がプロモーターと連結されてなるDNA断片、本発明遺伝子または上記DNA断片を含有するベクターおよび該ベクターが宿主の細胞に導入されてなる形質転換体を提供するものである。

【0005】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について詳細に説明する。なお、以下に記述された遺伝子工学的方法は、例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-309-6、「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-50338-X、Current Protocols In Protein Science (1995), John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-11184-8等の記載に準じて実施可能である。

【0006】

本発明遺伝子は配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有し、ショ糖分子中のD-グルコース残基の6位炭素原子に結合するヒドロキシル基にD-ガラクトシル基を α (1 \rightarrow 6)結合させることによりラフィノースを生成させる能力を有するタンパク質をコードする遺伝子であり、その具体例として、配列番号2で示される塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子をあげることができる。

【0007】

本発明遺伝子は、例えば、配列番号2で示される塩基配列またはその一部を有するDNA断片（以下、本DNA断片と記す。）をプローブとするハイブリダイゼーション法により、該プローブとハイブリダイズするDNA断片をダイズ等由来のDNAから検出し、該DNA断片を単離することにより得ることができる。

まず、本DNA断片を調製する。該DNA断片としては、例えば、配列番号2

で示される塩基配列に基づいて通常の方法で化学合成されたオリゴヌクレオチドからなるDNA断片があげられ、具体的には例えば、配列番号2で示される塩基配列における800番目から899番目までの塩基配列を有するDNA断片をあげることができる。

また、本DNA断片は、配列番号2で示される塩基配列に基づいて通常の方法で化学合成されたオリゴヌクレオチドをプライマーに用いたPCR法により調製してもよい。例えば、ダイズ(Glycin max)の組織を液体窒素中で凍結させた後、乳鉢などを用いて物理的に磨砕することにより細かい粉末状の組織片とし、該組織片から通常の方法によりRNAを抽出する。該抽出操作には、市販のRNA抽出キットを利用することができる。得られたRNA抽出液からエタノール沈澱によりRNAを回収し、このRNAから通常の方法によりポリA鎖を有するRNAを分画する。該分画操作には、市販のOligo dTカラムを利用することができる。このようにして得られたポリA鎖を有するRNAから通常の方法によりcDNAを合成する。該合成操作には、市販のcDNA合成キットを利用することができる。、前記cDNAを鋳型として、配列番号2で示される塩基配列を基にして設計・合成されたプライマーを用いてPCRを行なうことにより、本DNA断片を増幅する。ここでプライマーとしては、例えば、下記リスト1に示されるプライマー1と2をあげることができ、該プライマーを用いてダイズ由来のcDNAを鋳型としてPCRを行うことにより、配列番号2の塩基番号1~899に示される塩基配列を有するDNA断片を増幅することができる。増幅されたDNA断片は、「Molecular Cloning:A Laboratory Manual 2nd edition」(1989),Cold Spring Harbor Laboratory Press、「Current Protocols In Molecular Biology」(1987),John Wiley & Sons,Inc.ISBN0-471-50338-X等に記載される通常の方法に準じてクローニングすることができる。TAクローニングキット(Invitrogen社)等の市販のクローニングキットや、pBluescriptII(Stratagene社の)等の市販のプラスミドベクターなどを用いてクローニングしてもよい。クローニングされたDNA断片の塩基配列の確認は、F.Sanger,S.Nicklen,A.R.Coulson著、Proceedings of National Academy of Science U.S.A. (1977),74,5463頁-5467頁等に記載されるダイデオキシターミネーティング法により行なうことができる。例えば、市販のパーキンエルマー社のABI PRISM Dye Terminator

Cycle Sequencing Ready Reaction Kitなどを利用すると良い。

【0008】

(リスト1)

プライマー1 CCAATCTGAT CATGCTTGTG CCGAA 25mer

プライマー2 GGAACAAAGT TATGCACTAT TATTTAAGGT 30mer

【0009】

次いで、本DNA断片を標識しこれをハイブリダイゼーション法におけるプローブとしてダイズ等由来のDNAにハイブリダイズさせ、該プローブが特異的に結合するDNA断片を検出することにより、ラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNA断片を検出する。

ダイズ等由来のDNAとしては、例えば、ダイズのcDNAライブラリーやgenomic DNAライブラリー等を使用することができる。このような遺伝子ライブラリーには、市販の遺伝子ライブラリーをそのまま用いることもできるし、また「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Pressや「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される通常のライブラリー作製法に従って作製されたライブラリーを用いることもできる。

ハイブリダイゼーション法としては、プラークハイブリダイゼーションやコロニーハイブリダイゼーションをあげることができ、ライブラリーの作製に用いられたベクターの種類に応じて選択する。具体的には、使用されるライブラリーがファージベクターを用いて構築された場合には、まずライブラリーのファージを適当な宿主微生物と感染可能な条件下で混合して形質転換体を得た後、該形質転換体を軟寒天培地と混合し、寒天培地上にまく。その後適当な大きさのプラークが現れるまで37℃で培養を行う。また、使用されるライブラリーがプラスミドベクターで構築された場合には、まずライブラリーのプラスミドを適当な宿主微生物に導入し、形質転換体を得る。得られた形質転換体を適当に希釈して寒天培地にまき、適当な大きさのコロニーが現れるまで37℃で培養を行う。いずれのライブラリーの場合も上記の培養後、寒天培地の表面にメンブレンフィルターをのせ、ファージまたは形質転換体をメンブレンに転写する。このメンブレンをアルカ

リによる変性処理後、中和処理し、例えばナイロンメンブレンの場合には該メンブレンに紫外線を照射することにより、ファージまたは形質転換体のDNAをメンブレン上に固定する。次にこのメンブレンについて、通常の方法により標識された本DNA断片をプローブとして用いてハイブリダイゼーション法を行う。この方法については、例えば、D M Glover編「DNA cloning, a practical approach.」 IRL PRESS (1985) ISBN 0-947946-18-7を参考にとよい。ハイブリダイゼーションを行う際の試薬及び温度条件は多種存在するが、一般的には例えば、プレハイブリダイゼーションは、プレハイブリダイゼーション溶液 [$6\times$ SSC ($0.9M$ NaCl, $0.09M$ クエン酸)、 $0.1\sim 1(w/v)\%$ SDS、 $100\mu g/ml$ 変性サケ精巢DNA] にメンブレンを浸して $65^{\circ}C$ で1時間インキュベートする。次に、ここへ標識された本DNA断片を加えて混合し、 $42\sim 68^{\circ}C$ で4~16時間保温することによりハイブリダイゼーションを行う。ハイブリダイゼーション終了後メンブレンを取り出し、これを $0.1\sim 1(w/v)\%$ SDSを含む $2\times$ SSCで洗浄し、さらに $0.1\sim 1(w/v)\%$ SDSを含む $0.2\times$ SSCですすいだ後乾かす。このメンブレンを、例えば、オートラジオグラフィーなどにより解析してメンブレン上のプローブの位置を検出することにより、用いたプローブと相同性のある塩基配列を有するDNAのメンブレン上の位置を検出することができる。このようにして検出されたDNAのメンブレン上の位置に相当するクローンをもとの寒天培地上で特定しこれを釣菌することにより、当該DNAを有するクローンを単離することができ、さらに、同様の検出操作を繰り返すことで当該DNAを有するクローンを純化することができる。

また、市販のGibcoBRL社のGENE TRAPPER cDNA Positive Selection Systemキットの様な検出の方法を用いることもできる。この方法では、まず一本鎖化したDNAライブラリーとビオチン化した本DNA断片（プローブ）とをハイブリダイズさせた後、これにストレプトアビジン結合マグネットビーズを加えて混合し、この混合物からストレプトアビジン結合マグネットビーズを磁石で回収することで、本DNA断片、ビオチンおよびストレプトアビジンを介して該ビーズに結合した1本鎖DNA断片、すなわち、用いたプローブと相同性のある塩基配列を有する1本鎖DNA断片を回収する。尚、回収された1本鎖DNA断片は適当なオリゴヌクレオチドをプライマーとしてDNAポリメラーゼを反応させることにより2本鎖化

することができる。

【0010】

上記のように本DNA断片とハイブリダイズするDNAをダイズ等由来の遺伝子ライブラリーのDNAから検出し、当該DNAを保有するクローンを純化して該クローンからファージまたはプラスミドDNAを単離することにより、ラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNA断片を取得することができる。このようにして得られたDNA断片について通常の方法により制限酵素地図を作成するかまたは塩基配列を決定することにより、本発明遺伝子を含むDNA断片を確認することができる。さらに、このようにして得られる本発明遺伝子の部分塩基配列を有するDNA断片をプローブとして上記と同様に所望の生物由来のDNAにハイブリダイズさせ、該プローブが特異的に結合するDNA断片を検出することにより、ラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNA断片を検出する（以下、本発明検出方法と記す。）ことができる。

【0011】

本発明遺伝子の部分塩基配列を有するプライマーを用いるPCR法により、所望の生物由来のDNAからラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNA断片を増幅する（以下、本発明増幅方法と記す。）ことが可能である。

具体的には、例えば、本発明遺伝子の部分塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを設計し、通常の合成方法によりこれを化学合成する。オリゴヌクレオチドの長さとしては、一般的に、アニーリングの特異性が確保される点からは塩基数が多い方がよく、プライマー自身が高次構造を取り易くアニーリング効率が悪くなる恐れがある点や合成後の精製時に煩雑な操作が必要となる点からは塩基数が多すぎない方がよく、通常、塩基数が15以上50以下が好ましい。コドン表(図1)に基づき、1つのアミノ酸をコードしうるコドンのバリエーションに応じてプライマーの特定の位置の残基を数種類の塩基の混合物とするミックスプライマーを合成することもできる。また、例えば、複数種の塩基と対合できるイノシンなどの塩基を数種類の塩基の混合物の代わりに用いることもできる。尚、ここで、2本鎖DNAからなる本発明遺伝子のコーディング鎖と同じ塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをセンスプライマー、該コーディング鎖の塩基配列と相補的な塩基

配列を有するオリゴヌクレオチドをアンチセンスプライマーと呼ぶ。

本発明遺伝子のコーディング鎖の5' 上流側の塩基配列を有するセンスプライマーと、3' 下流側の塩基配列と相補的な塩基配列を有するアンチセンスプライマーを組み合わせて用いて、例えば、遺伝子ライブラリー、ゲノムDNAまたはcDNAを鋳型としてPCR反応を行いDNA断片を増幅する。ここで用いられる遺伝子ライブラリーとしては、例えば、ダイズ等のcDNAライブラリーやgenomicDNAライブラリー等をあげることができる。該遺伝子ライブラリーとしては、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Pressや「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される通常のライブラリー作製法に従って作製されたライブラリーを用いることもできるし、また市販の遺伝子ライブラリーをそのまま用いることもできる。ゲノムDNAまたはcDNAとしては、例えば、目的のダイズ等から調製されたgenomicDNAやcDNAをあげることができる。このようにして増幅されたDNA断片は通常の電気泳動法により確認することができ、該DNA断片は、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edition」(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press、「Current Protocols In Molecular Biology」(1987), John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される通常の方法に準じてクローニングすることができる。該DNA断片について通常の方法により制限酵素地図を作成するかまたは塩基配列を決定することにより、ラフィノース合成酵素遺伝子またはその一部を含むDNA断片を確認することができる。該DNA断片がラフィノース合成酵素遺伝子の一部を含む場合は、その塩基配列に基づき、該塩基配列の5' 末端より上流の塩基配列を含むDNA断片または該塩基配列の3' 末端より下流の塩基配列を含むDNA断片の増幅をPCR法で行うことができる。すなわち、上記のようにして得られたDNA断片の塩基配列に基づいて、5' 末端側上流部分の増幅にはアンチセンスプライマーを、3' 末端側下流部分の増幅にはセンスプライマーをそれぞれ設計し合成する。これらのプライマーを用いて、例えば、Clontech社のMarathon Kit等の市販のキットを用いてRACE法を行うことにより、ラフィノース合成酵素遺伝子の既得部分の5' 末端より上流または3' 末端より下流の塩基配列を明らかにすることが

できる。このようにして明らかにされた塩基配列に基づいて新たにプライマーを合成し、再度PCRを行うことにより完全長のラフィノース合成酵素遺伝子を取得することができる。

【0012】

上述の本発明検出方法を植物の解析に利用してもよい。具体的には、植物ゲノムDNAを、例えば、渡辺格監修、杉浦昌弘編集：「クローニングとシーケンス（植物バイオテクノロジー実験マニュアル）」、農村文化社、東京（1989）などに記載された通常の方法に従って調製し、適当な少なくとも数種類の制限酵素で切断し、電気泳動した後、泳動されたDNAを通常の方法に従ってフィルターにブロットニングする。このフィルターに本DNA断片から通常の方法で調製されたプローブを用いてハイブリダイゼーションを行ない、プローブがハイブリダイズするDNA断片を検出する。検出されたDNA断片の長さを特定植物種の異なる品種について比較し、その長さの違いから、品種間のラフィノース類オリゴ糖発現に伴う表現形質の差を解析することができる。また、上記の方法により検出されたDNA断片の長さを遺伝子組換え植物と同種の非遺伝子組換え植物とで比較したときに、遺伝子組換え植物において非遺伝子組換え植物よりもハイブリダイズするバンドが数多くまたは濃く検出された場合、該植物が遺伝子組換え植物であると判別することができる。この方法は、例えば、島本功、佐々木卓治監修：「植物のPCR実験プロトコル」、秀潤社、東京（1995）、ISBN4-87962-144-7、90-94頁に記載されるRFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)法に準じて行なうことができる。

【0013】

また、本発明増幅方法をダイズ等の遺伝子の解析に利用してもよい。具体的には、例えば、ダイズ等から調製した植物ゲノムDNAを鋳型として、本発明増幅方法を行ない、DNA断片を増幅させる。増幅されたDNA断片をホルムアルデヒド溶液と混合し、85℃で5分間加熱変性処理を行った後、氷上で急冷する。このサンプルをグリセロールを0(v/v)%または10(v/v)%含む、例えば6(w/v)%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動に供する。この電気泳動には市販のSSCP(Single Strand Conformation Polymorphism)用の電気泳動装置を用いることができ、例えば5

℃、25℃、37℃等にゲルの温度を一定に保って電気泳動を行なう。電気泳動したゲルから、例えば、市販の試薬による銀染色法等の方法によりDNA断片を検出する。検出されたDNA断片の電気泳動における挙動の品種間の差からラフィノース合成酵素遺伝子内の変異を検出し、該変異に基づいて生じる、ラフィノース類オリゴ糖発現に伴う表現形質における品種間の差を解析する。この方法は、例えば、島本功、佐々木卓治監修：「植物のPCR実験プロトコル」、秀潤社、東京(1995)、ISBN4-87962-144-7、141-146頁に記載されるSSCP法に準じて行うことができる。

【0014】

本発明遺伝子を宿主の細胞で発現させるには、本発明遺伝子がプロモーターと連結されてなるDNA断片（以下、本発明発現DNA断片と記す。）を利用するとよい。該DNA断片においてプロモーターは、該DNA断片が導入され形質転換される宿主の細胞内で機能可能なものであれば特に制限はない。例えば、大腸菌のラクトースオペロンのプロモーター、大腸菌のトリプトファンオペロンのプロモーター、tacプロモーター等の大腸菌内で機能可能な合成プロモーター、酵母のアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子（ADH）プロモーター、アデノウイルス・メジャーレート（Ad.ML）プロモーター、SV40の初期プロモーター、バキュロウイルスプロモーターなどがあげられる。また、宿主が植物である場合には、例えば、ノパリン合成酵素遺伝子(NOS)プロモーター、オクトピン合成酵素遺伝子(OCS)プロモーターなどのT-DNA由来の構成型プロモーター、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)由来の19S及び35Sプロモーターなどの植物ウイルス由来のプロモーター、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)遺伝子プロモーター、カルコンシンターゼ(CHS)遺伝子のプロモーター、Pathogenesis-related protein(PR)遺伝子のプロモーターなどの誘導プロモーターなどをあげることができる。また、特定の植物組織で特異的に発現するようなプロモーター、例えば、ダイズ由来種子貯蔵蛋白質グリシニン遺伝子のプロモーターを持つベクターpSUM-GY1（特開平06-189777）などを使用することもできる。

さらに、本発明発現DNA断片にターミネーターを連結させてもよい。この場合、発現させようとするラフィノース合成酵素遺伝子の下流にターミネーターを

有するように連結すると一般的によい。用いられるターミネーターは、形質転換される宿主の細胞内で機能可能なものであれば特に制限はないが、例えば宿主が植物の場合には、ノパリン合成酵素遺伝子(NOS)ターミネーターなどのT-DNA由来の構成型ターミネーター、ニンニクウイルスGV1、GV2のターミネーターなどの植物由来のターミネーターなどをあげることができる。

【0015】

かかる本発明発現DNA断片を通常の遺伝子工学的方法に準じて宿主の細胞に導入することにより形質転換体を得られる。尚、宿主の細胞に導入するための形質転換方法に応じて、必要であれば、本発明発現DNA断片を適当な選抜マーカー遺伝子を有するベクターに挿入して使用するとよい。

本発明発現DNA断片が挿入されたベクターは、例えば、宿主が微生物の場合には、「Molecular Cloning:A Laboratory Manual 2nd edition」(1989),Cold Spring Harbor Laboratory Pressや「Current Protocols In Molecular Biology」(1987),John Wiley & Sons,Inc.ISBN0-471-50338-X等に記載される通常の手段により微生物に導入することができ、該ベクターにより形質転換された微生物は抗生物質耐性や栄養要求性等の選抜マーカーにより選抜される。又、例えば、宿主が植物の場合には、本発明発現DNA断片が挿入されたベクターは、アグロバクテリウム感染方法(特公平2-58917および特開昭60-70080)、プロトプラストへのエレクトロポレーション方法(特開昭60-251887および特開平5-68575)、またはパーティクルガン方法(特開平5-508316および特開昭63-258525)などの通常の手段により植物細胞に導入することができ、該ベクターの導入により形質転換された植物細胞はカナマイシンまたはハイグロマイシン等の抗生物質耐性などの選抜マーカーにより選抜される。このようにして形質転換された植物細胞から、例えば内宮著、「植物遺伝子操作マニュアル(トランスジェニック植物の作り方)」1990年、講談社サイエンティフィック(ISBN4-06-153513-7)、27-55頁に記載される通常の植物細胞培養方法により形質転換植物を再生することにより形質転換体植物を得られる。さらに、得られた形質転換体植物から種子を得ることにより該形質転換体植物の増殖を行うこともできる。また、得られた形質転換体植物と非形質転換体植物とを交雑することで形質転換体の形質をもつ子孫植物を作成する

こともできる。

【0016】

本発明遺伝子を上記のように植物に導入し発現させることにより、植物におけるラフィノース合成酵素の発現量や活性を変化させることができ、植物のラフィノース類オリゴ糖含量が制御され得る。本発明遺伝子はとりわけ、遺伝子の相同性に基づいてダイズのラフィノース合成酵素の発現量や活性を変化させる、例えば相同組換えやコサプレッション等の技術において有用である。

【0017】

【実施例】

以下に実施例をあげて本発明をより詳細に説明するが、本発明は以下の実施例にのみ限定されるものではない。

【0018】

実施例1 (cDNAの作成)

ダイズ(*Glycine max*)Williams82の未熟種子あるいは約2gを液体窒素で凍結し、乳鉢で粉碎した。Isogen(ニッポンジーン社)を20ml加え、さらに良くすりつぶした。該破砕物を遠心管に移し、4mlのクロロホルムを加え、ボルテックスで攪拌した後、これを4℃で6, 500 x g、10分間遠心分離し、水層を回収した。回収された水層に10mlのイソプロパノールを加えて攪拌した後、4℃で6, 500 x g、10分間遠心分離した。得られた沈殿を10mlの70%エタノールで洗浄した後、これを1mlのElution buffer (10mM Tris-HCl/pH7.5, 1mM EDTA, 0.1%SDS)で溶解した。該溶解物を60℃で10分間おいた後、10,000 x gで1分間遠心分離し、不溶物を除去した。得られた上澄み液に等量のOligotex-dT30 (TAKARA社)を加え、攪拌し、65℃で5分間放置した。さらに氷上に移して3分間放置した後、5M NaClを200 μ l加え、混合し、37℃で10分間放置した。次にこれを4℃、10,000 x gで3分間遠心分離し、沈殿を回収した。回収された沈殿を1mlのTEバッファで懸濁し、65℃で5分間放置した。この懸濁液を氷上に移して3分間放置した後、4℃、10,000 x gで3分間遠心分離して沈殿を除去した。

得られた上澄み液に100 μ lの3M酢酸ナトリウムと2mlのエタノールを加えてRNAをエタノール沈澱し、これを回収した。回収されたRNAを70%エタノールで2回洗

浄し、これを20 μ lの滅菌水に溶解し、cDNA合成に用いた。得られたRNAは260nmの吸光度を測定し、定量した。

cDNA合成には、Amersham社のFirst strand synthesis for RT-PCRのキットとTakara社のcDNA Synthesis Kitを用い、すべての操作はキットに添付のプロトコールに従った。

【0019】

実施例2 (ダイズcDNAからのラフィノース合成酵素遺伝子のクローニング)

実施例1によりダイズ(Glycine max)Williams82の未熟種子から得られたcDNAを鋳型として、配列番号1で示されるアミノ酸配列に基づき設計されたプライマー、すなわち下記リスト2に示される塩基配列を有するプライマーを用いてDNA断片をPCRで増幅した。PCRは、Clontech社のAdvantage KlenTaq cDNA Kitを用いてパーキンエルマー社のGene Amp PCR Systems 2400とDNA Thermal Cycler Model 480で行なわれた。反応は94℃1分間、次いで50℃3分間、さらに72℃3分間の保温を1サイクルとして、この反応を40回行ってPCRによる増幅を行った。増幅されたDNA断片はTAクローニングキット(Invitrogen社)でクローニングし、パーキンエルマー社のABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kitを用いてシーケンス反応を行ない、ABI社373S DNA シーケンサーで解析を行った。この配列に基づいて下記のリスト3に示す配列を有するプライマーを合成した。実施例1によりダイズWilliams82の葉から得られたmRNAを用いてClontech社のMarathon KitによるcDNA合成を行い、得られたcDNAはリガーゼにより該キットに含まれるアダプターと結合した。これらの操作はキットに添付のプロトコールにしたがって実施した。このようにして調製されたアダプターが結合したcDNAを用いて、リスト3に示されるプライマーによるPCRを上記と同様に行った。遺伝子の両末端領域の塩基配列の解析はClontech社のMarathon Kitのプロトコールに準じて行った。これらの結果から、配列番号2に示される配列が明らかとなった。

【0020】

(リスト2)

5-F primer

41mer

CGATGGATGG GIAAITTIAT ICAICCGAI TGGGAIATGT T

6-RV primer

32mer

GGCCACATIT TIACIA(AG)ICC IATIGGIGCI AA

【0021】

(リスト3)

SC-2

30mer

TGTTACTAGG CGAAACAAGA GTAGCTCTGA

【0022】

(配列の簡単な説明)

1. 配列番号1:

配列番号1に示される配列は、本発明のラフィノース合成酵素遺伝子にコードされるラフィノース合成酵素蛋白質のアミノ酸配列を示す。

2. 配列番号2:

配列番号2に示される配列は、本発明のラフィノース合成酵素遺伝子の塩基配列を示す。

3. リスト1:

リスト1に示される配列は、ラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNA断片の増幅に用いられるプライマーの塩基配列の一例を示す。いずれも配列番号2の塩基配列に基づいている。プライマー1はセンスプライマー、プライマー2はアンチセンスプライマーである。目的に応じてこれらの塩基配列の5'-末端に適当な制限酵素の認識配列を加えることができる。

4. リスト2:

リスト2に示される配列は、本発明のラフィノース合成酵素遺伝子を含むDNA断片のクローニングに用いたプライマーの塩基配列を示す。Iで示した塩基はイノシンを合成に用いたことを示す。また、括弧で括られた塩基はこれらの混合物をDNA合成の際に用いたことを示す。なお、プライマー番号の後に記載の「RV」はこのプライマーがアンチセンスの配列であることを示す。

5. リスト3:

リスト3に示される配列は、本発明のラフィノース合成酵素遺伝子の塩基配列の解析の際に用いたプライマーの塩基配列を示す。SC-2は本発明遺伝子の 3' -

末端領域の塩基配列の解析に用いた。

【0023】

【発明の効果】

本発明により、ラフィノース合成酵素の植物における発現量や活性を変化させる技術に利用可能なラフィノース合成酵素遺伝子を提供することが可能となった。

【0024】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：265

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴

起源

生物名：ダイズ (Glycine max)

品種名：Williams82

組織の種類：種子及び葉

配列

Gln Ser Asp His Ala Cys Ala Glu Phe His Ala Ala Ser Arg Ala Ile

5

10

15

Ser Gly Gly Pro Ile Tyr Val Ser Asp Ser Val Gly Lys His Asn Phe

20

25

30

Lys Leu Leu Lys Lys Leu Val Leu Pro Asp Gly Ser Ile Leu Arg Cys

35

40

45

Gln His Tyr Ala Leu Pro Thr Arg Asp Cys Leu Phe Val Asp Pro Leu

50

55

60

His Asp Gly Lys Thr Met Leu Lys Ile Trp Asn Leu Asn Lys Cys Ser

65

70

75

80

Gly Val Leu Gly Leu Phe Asn Cys Gln Gly Gly Gly Trp Cys Pro Val

85

90

95

Thr Arg Arg Asn Lys Ser Ser Ser Asp Tyr Ser His Ser Val Thr Cys

100

105

110

Phe Ala Ser Pro Gln Asp Ile Glu Trp Gly Lys Gly Lys His Pro Val

115

120

125

Cys Ile Lys Gly Val Asp Val Phe Ala Val Tyr Met Phe Lys Asp Asp

130

135

140

Lys Leu Lys Leu Leu Lys Tyr Thr Glu Ser Val Glu Val Ser Leu Glu

145

150

155

160

Pro Phe Ser Cys Glu Leu Leu Thr Val Ser Pro Val Val Ile Leu Pro

165

170

175

Arg Lys Ser Ile Gln Phe Ala Pro Ile Gly Leu Val Asn Met Leu Asn

180

185

190

Ser Gly Gly Ser Ile Met Ser Leu Glu Phe Asp Gln Gln Glu Asn Leu

195

200

205

Ala Arg Ile Gly Val Arg Gly His Gly Glu Met Arg Val Phe Ala Ser

210

215

220

Glu Lys Pro Glu Ser Val Lys Ile Asp Gly Glu Ser Val Glu Phe Asp

225

230

235

240

Tyr Val Asp Arg Thr Val Arg Leu Gln Val Ser Trp Pro Cys Ser Ser

245

250

255

Arg Leu Ser Val Val Glu Tyr Leu Phe

260

265

【0025】

配列番号：2

配列の長さ：928

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号: peptide

存在位置: 2..799

特徴を決定した方法: E

配列

C CAA TCT GAT CAT GCT TGT GCC GAA TTC CAC GCT GCT TCT AGA GCC	46
Gln Ser Asp His Ala Cys Ala Glu Phe His Ala Ala Ser Arg Ala	
5 10 15	
ATT TCT GGT GGA CCA ATT TAT GTA AGC GAC TCT GTT GGA AAA CAC AAC	94
Ile Ser Gly Gly Pro Ile Tyr Val Ser Asp Ser Val Gly Lys His Asn	
20 25 30	
TTC AAG TTG CTT AAG AAG CTT GTT CTA CCT GAT GGC TCC ATT TTG CGG	142
Phe Lys Leu Leu Lys Lys Leu Val Leu Pro Asp Gly Ser Ile Leu Arg	
35 40 45	
TGT CAA CAT TAT GCA CTT CCC ACC CGA GAC TGC TTA TTT GTA GAT CCT	190
Cys Gln His Tyr Ala Leu Pro Thr Arg Asp Cys Leu Phe Val Asp Pro	
50 55 60	
TTA CAT GAT GGG AAA ACA ATG CTC AAA ATT TGG AAC CTC AAT AAA TGT	238
Leu His Asp Gly Lys Thr Met Leu Lys Ile Trp Asn Leu Asn Lys Cys	
65 70 75	
TCC GGG GTT TTG GGT CTG TTC AAT TGC CAA GGA GGA GGT TGG TGC CCT	286
Ser Gly Val Leu Gly Leu Phe Asn Cys Gln Gly Gly Gly Trp Cys Pro	
80 85 90 95	
GTT ACT AGG CGA AAC AAG AGT AGC TCT GAC TAT TCA CAC TCC GTG ACT	334
Val Thr Arg Arg Asn Lys Ser Ser Ser Asp Tyr Ser His Ser Val Thr	
100 105 110	
TGC TTT GCA AGT CCT CAA GAC ATT GAA TGG GGC AAA GGG AAG CAC CCA	382

Cys Phe Ala Ser Pro Gln Asp Ile Glu Trp Gly Lys Gly Lys His Pro	
115 120 125	
GTT TGC ATC AAA GGG GTG GAC GTA TTT GCT GTG TAC ATG TTT AAG GAC	430
Val Cys Ile Lys Gly Val Asp Val Phe Ala Val Tyr Met Phe Lys Asp	
130 135 140	
GAC AAG TTG AAG CTG CTG AAG TAC ACA GAG AGT GTA GAA GTT TCT CTT	478
Asp Lys Leu Lys Leu Leu Lys Tyr Thr Glu Ser Val Glu Val Ser Leu	
145 150 155	
GAG CCT TTT AGT TGT GAG CTT TTG ACC GTT TCT CCA GTG GTG ATC TTA	526
Glu Pro Phe Ser Cys Glu Leu Leu Thr Val Ser Pro Val Val Ile Leu	
160 165 170 175	
CCC AGA AAA TCA ATC CAA TTT GCC CCA ATT GGA TTG GTA AAC ATG CTC	574
Pro Arg Lys Ser Ile Gln Phe Ala Pro Ile Gly Leu Val Asn Met Leu	
180 185 190	
AAC TCT GGG GGC TCT ATT ATG TCA TTG GAA TTT GAT CAA CAG GAA AAT	622
Asn Ser Gly Gly Ser Ile Met Ser Leu Glu Phe Asp Gln Gln Glu Asn	
195 200 205	
TTG GCG AGG ATT GGG GTG AGA GGA CAT GGG GAA ATG AGG GTA TTT GCA	670
Leu Ala Arg Ile Gly Val Arg Gly His Gly Glu Met Arg Val Phe Ala	
210 215 220	
TCA GAG AAG CCA GAG AGT GTC AAG ATT GAT GGA GAA TCT GTG GAA TTT	718
Ser Glu Lys Pro Glu Ser Val Lys Ile Asp Gly Glu Ser Val Glu Phe	
225 230 235	
GAT TAT GTT GAT AGA ACC GTG AGG CTC CAA GTC TCG TGG CCT TGT TCT	766
Asp Tyr Val Asp Arg Thr Val Arg Leu Gln Val Ser Trp Pro Cys Ser	
240 245 250 255	
TCG AGG TTG TCC GTA GTC GAG TAT TTG TTC TGA ATCATGATTT GGTGTCCGAG	819
Ser Arg Leu Ser Val Val Glu Tyr Leu Phe	
260 265	

AGAGCCGTGT AATGTTTACA TAAACTGACT TAAGTGCATT AAGCAAATCC ACCTTAAATA 879
 ATAGTGCATA ACTTTGTTCC AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 928

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図1は、塩基配列にコードされるアミノ酸の対応を示すコドン表である。コドンは、5-末端が左側にくるように示し、mRNAにおける塩基配列を示している。UはRNAにおけるウラシル塩基を示しており、DNAにおいてはチミン塩基に相当する。

【書類名】

図面

【図 1】

Phe	UUU UUC	UCU UCC UCA UCG	UAU UAC	UGU UGC
Leu	UUA UUG	Ser	UAA UAG	Stop UGA
	CUU CUC		CAU CAC	Trp UGG
	CUA CUG		CAA CAG	Arg CGA CGG
Ile	AUU AUC AUA	ACU ACC ACA ACG	AAU AAC	AGU AGC
Met	AUG	Thr	AAA AAG	AGA AGG
Val	GUU GUC GUA GUG	GCU GCC GCA GCG	GAU GAC	GGU GGC GGA GGG
		Ala	GAA GAG	Gly

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

ラフィノース合成酵素の植物における発現量や活性を変化させる技術に利用可能なラフィノース合成酵素遺伝子を提供すること。

【解決手段】

配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するラフィノース合成酵素遺伝子等。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000002093

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100093285

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号 住友化学工業株式会社内

【氏名又は名称】 久保山 隆

【選任した代理人】

【識別番号】 100094477

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号 住友化学工業株式会社内

【氏名又は名称】 神野 直美

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002093]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

氏 名 住友化学工業株式会社